



PCT/FR 00/01620

REC'D 23 AUG 2000

WIPO

PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le **29 JUIN 2000**

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

**DOCUMENT DE PRIORITÉ
PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)**

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M+Planche', enclosed within a large, loopy oval stroke.

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 95 50 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

10 JUIN 1999

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

DATE DE REMISE DES PIÈCES N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL DÉPARTEMENT DE DÉPÔT DATE DE DÉPÔT 10 JUIN 1999		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE CABINET ORES 6 Avenue de Messine 75008 PARIS	
2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle <input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> demande divisionnaire <input type="checkbox"/> certificat d'utilité <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen Établissement du rapport de recherche <input type="checkbox"/> différé <input checked="" type="checkbox"/> immédiat Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non Titre de l'invention (200 caractères maximum) METHODE DE DETECTION PRECOCE DES FLAVIVIRUS ET SES APPLICATIONS		n° du pouvoir permanent références du correspondant téléphone CMG226/78BISFR	
3 DEMANDEUR (S) n° SIREN Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination INSTITUT PASTEUR		code APE-NAF Forme juridique Etablissement Public	
Nationalité (s) française Adresse (s) complète (s) 28 rue du Docteur Roux 75724 PARIS CEDEX 15		Pays FRANCE	
4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée			
5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES <input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission			
6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE pays d'origine FRANCE (priorité interne) numéro 99 07290 date de dépôt 09 JUIN 1999			nature de la demande
7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n° date n° date			
8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (nom et qualité du signataire) Béatrice ORES (n° 92-4046)		SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI	


DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1.. / 2..
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		BLOm226/78bisFR	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		99 07361	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)			
METHODE DE DETECTION PRECOCE DES FLAVIVIRUS ET SES APPLICATIONS			
LE(S) DEMANDEUR(S) :			
INSTITUT PASTEUR			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		DEUBEL	
Prénoms		Vincent	
Adresse	Rue	29 boulevard du Lycée	
	Code postal et ville	92170	VANVES
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		FLAMAND	
Prénoms		Marie	
Adresse	Rue	20 rue Philibert-Lucot	
	Code postal et ville	75013	PARIS
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		DESPRES	
Prénoms		Philippe	
Adresse	Rue	18 place de la Liberté	
	Code postal et ville	92250	LA GARENNE-COLOMBES
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)			
 Béatrice ORES (n° 92-4046)			


DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2../2..
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		BLOrm226/78bisFR	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		99 07361	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)			
METHODE DE DETECTION PRECOCE DES FLAVIVIRUS ET SES APPLICATIONS			
LE(S) DEMANDEUR(S) :			
INSTITUT PASTEUR			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		MEGRET	
Prénoms		Françoise	
Adresse	Rue	14 rue Fantin Latour	
	Code postal et ville	75016	PARIS
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		ALCON	
Prénoms		Sophie	
Adresse	Rue	35 allée Montpensier	
	Code postal et ville	93190	LIVRY-GARGAN
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)			
 Béatrice ORES (n° 92-4046)			

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDEICATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
Planche 1/4				9/12/2000	
3/4				h	

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention «R.M.» (revendications modifiées).

La présente invention est relative à une méthode de détection précoce des flavivirus, notamment du virus de la dengue et à ses applications.

La dengue est une maladie tropicale aiguë fébrile dont le virus causal est un arbovirus, transmis par des moustiques. Les vecteurs de la maladie sont des moustiques du genre *Aedes*, notamment *Aedes aegypti* dont les gîtes larvaires sont le plus souvent domestiques et péri-domestiques. Le virus responsable, isolé en 1951, a été classé en quatre types antigéniques différents (DEN1, DEN2, DEN3 et DEN4). Il appartient à la famille des *Flaviviridae*, genre flavivirus.

Plus de deux milliards d'habitants vivent dans les zones endémiques et le nombre d'individus infectés par le virus s'élèverait à plus de 60 millions par an. La dengue est notamment responsable de 200 000 hospitalisations et de plusieurs dizaines de milliers de décès annuels, des enfants, pour la plupart.

Après une incubation de cinq à huit jours, le début des signes cliniques est généralement soudain et consiste en l'apparition de fièvre non différenciée (DF *dengue fever*) accompagnée de céphalées sévères, de lombalgies, de douleurs musculaires et articulaires ainsi que de frissons. Du troisième au cinquième jour de phase fébrile, peut apparaître une éruption maculo-papuleuse congestive durant trois à quatre jours (dengue classique).

Dans sa forme sévère, l'infection peut aboutir à l'apparition d'un syndrome hémorragique (DHF ou *dengue haemorrhagic fever*), caractérisé par une perméabilité vasculaire accrue et un dérèglement de l'hémostase. Alors que dans la majorité des cas, l'évolution est généralement favorable en une semaine, l'issue de la maladie peut être fatale en cas de choc hypovolémique (DSS ou *dengue shock syndrome*). Ces complications sont généralement observées en présence d'une immunité pré-existante, acquise notamment lors d'une primo-infection par un virus hétérologue de la dengue (sérotypage différent). En effet, deux types différents de réponse sérologique sont identifiés chez les sujets infectés par la dengue : les individus qui n'ont jamais eu une infection à flavivirus et n'ont pas été vaccinés contre un autre flavivirus (virus de la fièvre jaune, virus de l'encéphalite japonaise par exemple) vont présenter une réponse primaire, caractérisée par une apparition lente des anticorps spécifiques du virus responsable de l'infection ; les individus qui ont déjà eu une

infection à flavivirus (autre sérotype de la dengue, par exemple) ou ont été vaccinés contre un autre flavivirus vont présenter une réponse secondaire, caractérisée par une apparition rapide des anticorps.

L'agent infectieux est le virus de la dengue appartenant à la famille
 5 des *Flaviviridae*, à laquelle appartiennent également le virus de la fièvre jaune et celui de l'encéphalite japonaise (T.P. Monath et al., (1996) *Flaviviruses* in B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howly et al. (eds.) "Fields Virology" Philadelphia : Lippincott Raven Press Publishers). Ces virus possèdent un ARN monocaténaire de polarité positive qui comprend 11000 nucléotides et qui code pour une polyprotéine d'environ
 10 3400 acides aminés. Elle s'individualise en trois protéines de structure et sept protéines non structurales NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5, au cours de clivages co- et post-traductionnels par des protéases virales et cellulaires. La protéine non structurale NS1 a été identifiée pour la première fois en 1970 par P.K. Russel et al. (*J. immunol.*, (1970), 105, 838-845) et caractérisée en 1985 par G.W. Smith et al.
 15 (*J. Gen Virol.*, (1985), 66, 559-571). Cette glycoprotéine hautement conservée dans la famille des flavivirus (T.P. Monath déjà cité), notamment dans les quatre sérotypes du virus de la dengue, existe sous une forme intracellulaire, et sous une forme extracellulaire. La forme intracellulaire interviendrait dans les phases précoces de la réplication du virus (J.M. Mackenzie et al., *Virology*, (1996), 220, 232-240). Avant
 20 d'être transportée vers la membrane plasmique, la protéine NS1 subit une dimérisation. Dans les cellules de mammifères, mais pas dans les cellules d'insectes, une partie de la protéine NS1 est libérée dans le milieu extracellulaire soit sous forme d'une protéine soluble, soit sous forme microparticulaire. Lorsqu'elle est sous forme soluble, la protéine existe sous forme d'un oligomère, notamment d'un pentamère ou
 25 d'un hexamère (Crooks A.J. et al. *J. Chrom.* (1990), 502, 59-68 et *J. Gen. Virol.* (1994), 75, 3453-3460). A l'heure actuelle le rôle de la protéine NS1 n'est pas connu.

Plusieurs études suggèrent un rôle de la protéine NS1 dans la réponse immunitaire protectrice contre les infections à flavivirus. Des expériences réalisées avec les virus de la fièvre jaune, de la dengue, de l'encéphalite japonaise et
 30 de l'encéphalite à tique ont montré une protection contre une dose mortelle de virus homologue chez les animaux vaccinés à l'aide de la protéine NS1 sous-unitaire ou

produite par des virus vecteurs, type vaccine ou adénovirus (Schlesinger *et al.* (1986), 60, 1153-1155 ; *J. Gen. Virol.*, (1987), 68, 853-857; Falgout *et al. J. Virol.*, (1990), 64, 4356-4363 ; Jacobs *et al.*, *J. Virol.*, (1992), 66, 2086-2095). L'immunisation passive de souris par des anticorps monoclonaux anti-NS1 a également permis
 5 d'obtenir un certain degré de protection (Schlesinger *et al. J. Immunol.* (1985), 135, 2805-2809 ; Gould *et al. J. Gen. Virol.*, (1986), 67, 591-595; Henchal *et al. J. Gen. Virol.*, (1988), 69, 2101-2107). On ne connaît pas totalement le rôle des anticorps anti-NS1 dans la protection mais il se pourrait qu'elle soit associée à une lyse des cellules infectées (Schlesinger *et al. Virology*, (1993), 192, 132-141). Les protéines NS1 à la
 10 surface des cellules infectées seraient reconnues par les anticorps fixant le complément.

Il n'existe pas de traitement spécifique et les soins apportés au patient sont uniquement symptomatiques. Dans le cas de la dengue classique, le traitement repose sur l'administration d'antalgiques et d'antipyrétiques. Dans le cas de
 15 DHF, le traitement consiste en une perfusion pour compenser la fuite plasmatique, associée à la correction des troubles hydroélectriques et la relance de la diurèse.

Il n'existe pas de vaccin commercialisé contre le virus de la dengue. En revanche des essais de protection par des souches atténuées des 4 sérotypes du virus de la dengue ont été effectués par N. Bhamarapravati *et al.* (*Dengue and Dengue
 20 haemorrhagic fever* (1997), 367-377) avec des résultats non satisfaisants. La prévention repose donc uniquement sur la lutte contre le vecteur. Cette lutte associe une destruction larvaire et des pulvérisations "adulticides".

En l'absence de vaccin, il est nécessaire de surveiller les épidémies et prévenir les complications précitées ; pour ce faire, des programmes de surveillance
 25 active ont notamment été mis en place par l'Organisation Mondiale de la Santé et comprennent essentiellement la surveillance des cas de fièvre et des insectes vecteurs et le dépistage sérologique et virologique des personnes présentant une fièvre et suspectées être infectées par le virus de la dengue.

L'étiologie de la dengue est parfois délicate à affirmer lorsqu'un
 30 malade présente un syndrome fébrile indifférencié type "dengue-like" qui peut avoir comme origine un autre arbovirus, des virus provoquant des fièvres éruptives, la

grippe, la leptospirose et même le paludisme. Seul un examen de laboratoire peut apporter le diagnostic.

Il existe à l'heure actuelle plusieurs tests de diagnostic de la dengue. Toutefois, pour arriver à un résultat interprétable, il est nécessaire de combiner
5 plusieurs méthodes :

- l'isolement du virus, par des techniques de virologie classique, notamment par infection de cultures de cellules ou propagation en cerveau de souris ou amplification par inoculation aux moustiques et examen par exemple par immunofluorescence. Ces méthodes ont l'inconvénient d'être très difficiles à
10 mettre en œuvre et de dépendre de la précocité du prélèvement et de bonnes conditions de conservation ; de plus, les premiers résultats ne peuvent être obtenus en moins d'une semaine ; pour pallier ces inconvénients, on peut avoir recours à un test par RT/PCR (V. Deubel, *L'eurobiologiste* (1997), tome XXXI, 37-155) ; toutefois, ce moyen n'est pas toujours fiable, ne peut pas être utilisé en routine dans les pays
15 concernés par l'infection par le virus de la dengue pour des raisons de coût et d'équipement ;

- les tests sérologiques ; le diagnostic sérologique le plus précoce consiste à rechercher des IgM par la technique MAC-ELISA (*immunoglobulin M Antibody Capture Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). Leur détection permet
20 d'établir un diagnostic de probabilité d'infection par un flavivirus dès la défervescence de la fièvre ; la recherche des IgG nécessite deux prélèvements : l'un au début des signes cliniques, l'autre 10 à 28 jours après, de façon à mettre en évidence une conversion sérologique par réaction d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) ou par ELISA.

Il a également été proposé des tests immunologiques simples et peu
25 chers, utilisables dans les pays à risque, qui mettent en œuvre, comme réactif immunologique spécifique des peptides dérivés de la protéine non structurale NS1 caractéristique des flavivirus. Ainsi, le brevet US 5 824 506 décrit une méthode utilisant des peptides dérivés de la protéine non structurale NS1, qui permet de
30 détecter les anticorps induits par la présence du virus de la dengue ; toutefois les peptides sélectionnés reconnaissent essentiellement les échantillons obtenus à partir de

sujets convalescents et reconnaissent également mieux les patients infectés pour la seconde fois que ceux infectés pour la première fois ; ces résultats décevants pourraient s'expliquer, soit par le fait que les titres en anticorps sont variables pendant la phase aiguë (phase clinique) de la maladie, soit par le fait que les peptides utilisés ne sont pas représentatifs des caractéristiques antigéniques de la protéine et donc conduisent à une mauvaise reconnaissance des anticorps recherchés.

Dans tous les cas, seule la confirmation tardive d'une infection par un flavivirus peut être apportée.

Pour résoudre ce problème, Andrew Falconar et son équipe (*Report from the Sir Albert Sakzewski Virus Research Centre Royal Children's Hospital, 1991*) ont proposé de détecter la présence de la glycoprotéine non structurale NS1 elle-même. Ils ont mis au point un test ELISA de type double sandwich, dans lequel un sérum de lapin contenant des anticorps polyclonaux anti-NS1, utilisé comme anticorps de capture, est immobilisé sur une plaque de microtitration. L'antigène capturé est détecté à l'aide d'anticorps monoclonaux de souris dirigés soit contre le virus de type DEN2, soit spécifique de groupe ; la révélation de la formation du complexe antigène/anticorps est effectuée à l'aide d'IgG de chèvre anti-souris conjuguées à la peroxydase. Par cette méthode, les Auteurs ont montré qu'en utilisant de la protéine NS1 dimérique purifiée ou dégradée comme standard, la sensibilité de détection du test est d'environ 4 ng/ml avec les anticorps monoclonaux DEN2 comme sonde de révélation et d'environ 60 ng/ml avec les anticorps monoclonaux de groupe.

Toutefois, ce test ne permet de détecter la protéine NS1 ni dans les cas d'infections primaires en phase aiguë ou convalescente, ni dans les infections secondaires en phase convalescente dans lesquelles il existe un titre élevé en anticorps anti-NS1 ; les Auteurs en ont conclu que la protéine NS1 devait être présente en quantités importantes uniquement dans les cas d'infections secondaires et ce, de manière transitoire, pendant l'infection.

Or, les Inventeurs ont mis au point un procédé de purification de la protéine NS1 d'un flavivirus sous forme hexamérique, ce qui leur a permis de sélectionner des anticorps spécifiques de cette protéine sous forme hexamérique, dimérique ou monomérique, ou d'un de ses fragments, et de montrer de manière

surprenante que ces anticorps sont des outils de choix pour la mise en évidence des différentes formes de la protéine NS1 circulante dans le cadre d'une infection par un flavivirus, en particulier dans les phases précoces où la réponse en anticorps spécifiques est indétectable, notamment lors des infections primaires par le virus de la dengue.

En conséquence, les Inventeurs se sont donné pour but de pourvoir à une méthode de détection précoce d'une infection flavivirale, qui répond mieux aux besoins de la pratique que les procédés de l'état antérieur de la technique, c'est-à-dire un procédé qui soit fiable, rapide, peu coûteux et qui permet d'adapter à temps les soins médicaux et d'éviter des épidémies de grande envergure par la mise en œuvre d'actions anti-vectorielles rapides et massives.

La présente invention a en conséquence pour objet une méthode de détection précoce d'une infection flavivirale, caractérisée en ce qu'elle comprend la détection de la glycoprotéine non structurale NS1 d'un flavivirus dans un échantillon biologique, pendant la phase clinique de l'infection, par une méthode immunologique mettant en œuvre au moins deux anticorps identiques ou différents,

- le premier anticorps ou anticorps de capture de la glycoprotéine NS1 étant constitué par des anticorps choisis dans le groupe constitué par :

- des anticorps polyclonaux préalablement sélectionnés par immunocapture sur la protéine NS1 dudit flavivirus, de forme hexamérique, dimérique ou monomérique, lesdites formes étant non dégradées et

- des mélanges d'anticorps monoclonaux anti-NS1 préalablement sélectionnés pour leur affinité pour la protéine NS1 dudit flavivirus, de forme hexamérique, dimérique ou monomérique, lesdites formes étant non dégradées, lesdits anticorps monoclonaux étant ensuite purifiés,

- le deuxième anticorps ou anticorps de révélation étant choisi dans le groupe constitué par :

- des anticorps polyclonaux dirigés contre la protéine NS1 de même type que celle à détecter et

- un mélange d'anticorps monoclonaux dirigés contre une protéine NS1 de même type que celle à détecter.

Au sens de la présente invention, on entend par forme non dégradée de la protéine NS1 d'un flavivirus, la protéine native ou un de ses fragments, sous forme hexamérique, dimérique ou monomérique, comportant au moins un épitope permettant l'immunocapture, notamment un des épitopes rassemblés dans le tableau 1
5 page 319 de l'article de A. K.I. Falconar *et al.*, *Arch ; Virol.*, (1994), 137.

Au sens de la présente invention, on entend par anticorps polyclonaux et monoclonaux dirigés contre la protéine NS1 d'un flavivirus, des anticorps obtenus par immunisation d'un mammifère non humain,

- soit par une protéine NS1 de forme hexamérique, dimérique ou
10 monomérique, lesdites formes étant non dégradées,

- soit par un flavivirus vivant ou inactivé,
lesdits anticorps polyclonaux étant sélectionnés pour leur affinité pour la protéine NS1 sous ses différentes formes et purifiés en une seule étape et lesdits anticorps monoclonaux étant sélectionnés pour leur affinité pour la protéine NS1 sous ses
15 différentes formes puis purifiés par des techniques classiques, notamment par chromatographie d'affinité ou échange d'ions.

De manière surprenante, l'utilisation, pour la détection de la protéine NS1 dans un échantillon biologique, d'anticorps polyclonaux sélectionnés et purifiés par immunocapture sur la protéine NS1 de forme hexamérique, dimérique ou
20 monomérique, lesdites formes étant non dégradées ou d'anticorps monoclonaux préalablement sélectionnés pour leur réactivité vis-à-vis de la protéine NS1 de forme hexamérique, dimérique ou monomérique, lesdites formes étant non dégradées, et purifiés, en lieu et place d'un sérum total de lapin hyperimmunisé, permet d'améliorer de manière significative la sensibilité de la méthode et de mettre en évidence la
25 protéine NS1 circulant dans le sang des malades, dès le stade précoce de l'infection, aussi bien lors d'une infection primaire que d'une infection secondaire.

La méthode selon la présente invention possède un certain nombre d'avantages :

- elle peut être mise en œuvre de manière précoce : la présence de la
30 glycoprotéine NS1 est révélée lors de la phase clinique, avant que la réponse en anticorps ne soit détectable,

- elle est sensible : on peut détecter jusqu'à moins de 2 ng de protéine/ml de sérum, ce qui permet de détecter la protéine NS1 circulante dans la phase précoce des infections primaires,

- elle est rapide : on peut obtenir une réponse dans la journée,

5 - elle est relativement peu coûteuse et peut donc être utilisée dans les pays à risque,

- elle permet de distinguer les personnes vaccinées des personnes infectées récemment par un flavivirus puisque la protéine NS1 sera absente chez les personnes vaccinées chez lesquelles les anticorps pourraient encore être décelables..

10 Selon un mode de mise en œuvre avantageux de ladite méthode l'infection flavivirale est une infection par le virus de la dengue.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux de ladite méthode, le premier anticorps est de préférence fixé sur un support solide convenable et le deuxième anticorps est éventuellement conjugué à un marqueur approprié.

15 Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux de ladite méthode, lorsque le deuxième anticorps n'est pas conjugué à un marqueur, sa liaison à la protéine NS1 fixée sur le support solide est alors détectée par un troisième anticorps conjugué à un marqueur convenable, ledit troisième anticorps étant un anticorps classiquement utilisé, tel que par exemple une IgG dirigée contre le deuxième
20 anticorps et produite notamment chez la chèvre, le porc ou l'âne.

Parmi les marqueurs utilisés, on peut citer à titre d'exemple les marqueurs fluorescents, le système biotine/streptavidine, les marqueurs non isotopiques ou des enzymes, comme par exemple la peroxydase de raifort ou la phosphatase alcaline.

25 Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux de ladite méthode, ledit troisième anticorps est conjugué à une enzyme.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux de ladite méthode,

- le premier anticorps ou anticorps de capture est constitué par des
30 anticorps polyclonaux de souris, sélectionnés par immunocapture sur la protéine NS1 du virus de la dengue, ladite protéine étant sous forme hexamérique, et

- le deuxième anticorps ou anticorps de détection de la présence de NS1 dans l'échantillon biologique à analyser, est constitué par des anticorps polyclonaux de lapin immunisé par de la protéine NS1 du virus de la dengue, ladite protéine étant sous forme hexamérique, la fixation dudit deuxième anticorps étant
5 révélé par un troisième anticorps constitué par des anticorps, conjugués à la peroxydase et dirigés contre le deuxième anticorps.

Selon un autre mode de mise en œuvre encore plus avantageux de ladite méthode, les anticorps polyclonaux de souris sont purifiés par immunocapture sur de la protéine NS1 hexamérique de dengue de sérotype 1.

10 La présente invention a également pour objet un kit ou coffret de diagnostic d'une infection flavivirale, caractérisé en ce qu'il comprend :

- au moins un anticorps de capture et au moins un anticorps de révélation tels que définis précédemment,

- au moins un contrôle positif constitué par la protéine NS1 d'un
15 flavivirus et/ou de différents sérotypes selon le flavivirus, ladite protéine, étant sous forme hexamérique, dimérique ou monomérique, lesdites formes étant non dégradées, et

- au moins un contrôle négatif constitué par un sérum humain normal.

20 Selon un mode de réalisation avantageux du coffret de diagnostic selon l'invention, ladite protéine NS1 sous ses différentes formes est obtenue à partir d'un surnageant de culture, soit de cellules de mammifères infectées, soit de cellules de mammifères transfectées par un plasmide recombiné, comportant le gène de la protéine NS1 ou un fragment dudit gène ou un fragment du génome flaviviral, lesdits
25 fragments étant aptes à exprimer la protéine NS1.

Selon un autre mode de réalisation avantageux du coffret de diagnostic selon l'invention, la protéine NS1 est celle du virus de la dengue.

Selon un autre mode de réalisation encore plus avantageux dudit coffret de diagnostic, le plasmide est le plasmide pCIneo-NS1.FGA qui a été déposé
30 auprès de la Collection Nationale de Cultures et de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur sous le numéro I-2220, en date du 7 juin 1999.

La présente invention a également pour objet un procédé de purification de la protéine NS1 d'un flavivirus, sous forme hexamérique, à partir d'un surnageant de culture, soit de cellules de mammifères infectées, soit de cellules de mammifères transfectées par un plasmide recombiné, comportant le gène de la protéine NS1 d'un flavivirus ou un fragment dudit gène ou un fragment du génome flaviviral, lesdits fragments étant aptes à exprimer la protéine NS1, caractérisé en ce que l'on sépare la forme soluble de la protéine NS1 de la forme microparticulaire de ladite protéine,

- soit par traitement par un agent précipitant puis centrifugation à une vitesse supérieure ou égale à 10 000 g,

- soit par centrifugation à une vitesse supérieure ou égale à 50 000 g, avant l'étape de purification réalisée par des techniques classiques, notamment par chromatographie d'affinité.

Au sens de la présente invention, on entend par agent précipitant, un agent qui précipite spécifiquement les protéines microparticulaires ou débris cellulaires, comme par exemple le polyéthylèneglycol, ledit agent étant utilisé dans des conditions classiques qui permettent de séparer des protéines solubles et des protéines microparticulaires ou débris cellulaires.

Dans un mode préféré de mise en œuvre dudit procédé de purification, la protéine hexamérique NS1 est celle du virus de la dengue, notamment le virus de la dengue de sérotype 1.

La présente invention a également pour objet une composition immunogène, caractérisée en ce qu'elle comprend un principe actif sélectionné dans le groupe constitué par :

- la protéine NS1 d'un flavivirus, de forme hexamérique, éventuellement associée à d'autres protéines,

- une séquence d'ADN codant pour ladite protéine NS1 et

- un système d'expression comprenant au moins un promoteur capable de faire exprimer chez l'hôte où elle est injectée, l'ADN codant pour la protéine NS1 du flavivirus, ledit gène exprimant ladite protéine, en association avec au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Des protocoles de vaccination utilisant des acides nucléiques sont notamment décrit dans la demande internationale WO 90/11092.

Dans un mode préféré de réalisation de la composition immunogène selon la présente invention, la composition immunogène comprend au moins un
5 mélange des protéines NS1 de forme hexamérique correspondant aux différents sérotypes du virus de la dengue.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'une protéine NS1 de forme hexamérique d'un flavivirus, pour la préparation d'une composition immunogène capable d'induire la production d'anticorps *in vivo*.

10 Dans un mode préféré de ladite utilisation, la protéine NS1 est celle du virus de la dengue, notamment de sérotype 1.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'au moins un anticorps monoclonal anti-NS1 préalablement sélectionné pour sa réactivité vis-à-vis de la protéine NS1 de forme hexamérique, dimérique ou monomérique, lesdites
15 formes étant non dégradées, lesdits anticorps monoclonaux étant ensuite purifiés, et modifiés pour la fabrication d'un médicament apte à induire une immunisation passive.

De manière avantageuse les modifications des anticorps sont notamment la sélection de fragments Fab ou l'humanisation des anticorps.

20 La présente invention a également pour objet l'utilisation de la protéine NS1 de forme hexamérique dimérique ou monomérique, lesdites formes étant non dégradées, pour sélectionner *in vitro* des anticorps spécifiques de ladite protéine NS1.

Dans un mode de réalisation avantageux de ladite utilisation, les
25 anticorps sont des anticorps polyclonaux.

Dans un autre mode de réalisation avantageux de ladite utilisation, les anticorps sont des anticorps monoclonaux.

Dans un autre mode de réalisation avantageux de ladite utilisation, la protéine est la protéine NS1 du virus de la dengue, notamment de sérotype 1.

Les anticorps monoclonaux anti-NS1 sont avantageusement obtenus par fusion de cellules spléniques de souris immunisée par la protéine NS1 de forme hexamérique avec des cellules myélomateuses appropriées.

La présente invention a également pour objet un procédé
5 d'expression d'un polynucléotide codant pour la protéine NS1 d'un virus de la dengue, caractérisé en ce qu'il comprend l'expression d'un polynucléotide tel que défini à la séquence SEQ ID N° 1, associé à un promoteur dudit polynucléotide dans des cellules eucaryotes convenables.

Dans un mode de mise en oeuvre préféré dudit procédé d'expression,
10 la protéine NS1 exprimée est celle du virus de la dengue de sérotype 1.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaissent dans la suite de la description et des exemples illustrés par les figures dans lesquelles :

- la figure 1 représente la protéine NS1 extracellulaire hexamérique purifiée obtenue après chromatographie d'exclusion (a) après chromatographie
15 d'exclusion, la protéine est concentrée à 0,5 mg/ml par ultrafiltration et traitée par du diméthylsuberimide (DMS) à 0, 0,5, 5 et 50 mM. Les produits obtenus sont placés dans un tampon non réducteur de Laemmli, séparés sur un gel d'acrylamide de gradient 4 à 20 % et marqués au bleu de Coomassie. Un échantillon traité par du DMS 50 mM est chauffé pendant 3 min à 95 °C avant électrophorèse pour dissocier les
20 oligomères non covalents. (b) La protéine NS1 purifiée est traitée pendant une nuit à 37 °C par 0,5 % ou 1 % de *n*-octylglucoside (nOG) et éventuellement traitée par 25 mM de DMS pendant 1 heure. Les protéines sont séparées sans dénaturation à chaud sur un gel d'acrylamide de gradient 4 à 20 % et détectée par *immunoblotting* avec un anticorps monoclonal anti-NS1 de la littérature ou tel que défini
25 précédemment.

- la figure 2 représente la séquence de la protéine NS1 du virus de la dengue de sérotype 1 obtenue par le clone 4C de l'exemple 2 ci-après, ainsi que la séquence codante correspondante.

- la figure 3 illustre les résultats obtenus par dosage de la protéine
30 NS1 circulante par la méthode de détection par ELISA-capture chez des patients infectés préalablement par un virus de la dengue dont les sérums ont été prélevés lors

des phases aiguës et convalescentes, ainsi que la comparaison avec les résultats obtenus par les techniques de l'art antérieur IHA (inhibition d'hémagglutination des sérotypes 1, 2, 3 ou 4 du virus de la dengue) et MAC ELISA (*immunoglobulin M Antibody Capture Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) ; D1 correspond au sérotype 1 de la dengue ; D2 correspond au sérotype 2 de la dengue; D3 correspond au sérotype 3 de la dengue et D4 correspond au sérotype 4 de la dengue ; ID = identité du malade ; 1 correspond au premier prélèvement en phase aiguë de la maladie 2 correspond au deuxième prélèvement en phase convalescente (effectuée 2 à 4 semaines après le premier) ; dans le test ELISA-capture, les valeurs sont exprimées en densité optique
 10 obtenues pour un même sérum dilué 10, 30 ou 90 fois.

- la figure 4 illustre la détection de la protéine NS1 par le test ELISA-capture sur des sérums de patients infectés par le virus de la dengue de sérotype 1 de Guyane. Les chiffres indiqués représentent le nombre de patients répartis par catégorie (positivité ou négativité en ELISA-capture et positivité ou négativité en
 15 IgM).

Exemple 1 : Purification de la protéine NS1 du virus de la dengue, sérotype 1

1. Matériel et méthodes

La protéine est produite sur cellules Véro infectées par le virus de la
 20 dengue, sérotype 1, souche FGA/89 (P. Després *et al.*, *Virol.*, (1993), **196**, 209-219), dans les conditions adaptées de la méthode décrite par A.K.I. Falconar *et al.*, (*J. Virol. Meth.*, (1990), **30**, 323-332).

Le milieu de culture est récolté 5 jours après l'infection et centrifugé à 1500 g pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant de centrifugation est
 25 ramené à 20 mM Tris-HCl, 1 mM azide de sodium, concentré 6 fois par ultrafiltration à froid et les particules virales sont éliminées par une précipitation de 2 h à 4 °C, à une concentration de 7,5 % en polyéthylèneglycol (PEG), suivie d'une centrifugation de 30 min. à 10 000 g. Le surnageant clarifié, contenant 7,5 % PEG est traité avec 0,05 % Tween 20 et 1 mg/ml d'aprotinine, puis passé sur une colonne d'immunoaffinité sur
 30 laquelle est fixé un anticorps monoclonal anti-NS1. La protéine est éluée selon la technique à la diéthylamine, telle que décrite dans Falconar *et al.*, (précité), concentrée

par ultrafiltration et la solution d'élution échangée par un tampon 10 mM Tris-HCl pH 7,5 contenant 1 mM d'azide de sodium.

2. Résultats

Les résultats sont illustrés dans la figure 1.

5 La figure 1a montre que la protéine NS1 est bien sous forme hexamérique. La proportion de forme hexamérique augmente avec une concentration croissante en DMS (figure 1a).

La protéine de forme hexamérique extracellulaire NS1 peut être transformée en sous-unités dimériques en présence du détergent non ionique, 10 *n*-octylglucoside (nOG) (figure 1b). Après une nuit à 37°C en absence ou en présence de *n*-octylglucoside (nOG) et traitement par du DMS 25 mM, on observe, en l'absence de nOG, la présence de bandes correspondant au dimère, au tétramère et à l'hexamère et en présence de nOG, une dissociation partielle ou complète de l'hexamère en fonction de la concentratin en nOG (figure 1b).

15

Exemple 2: Expression de la protéine NS1 du virus de la dengue de sérotype 1 par des cellules Vero

1. Matériel et méthode

20 Le plasmide pCIneo-NS1.FGA déposé auprès de la Collection Nationale de Cultures et de Microorganismes (CNCM) de l'Institut Pasteur sous le n° I-2220, en date du 7 juin 1999) contenant le gène de la protéine NS1 comprenant le gène codant pour son peptide signal, précédé d'un codon d'initiation de la traduction et suivi d'un codon de terminaison de la traduction est introduit dans la bactérie 25 compétente *Escherichia coli* (Epicurian SURE de Stratagène). Ce plasmide est amplifié en culture bactérienne et purifié selon la technique classique de préparation d'ADN plasmidique. L'ADN purifié est utilisé pour le séquençage de différents clones (la séquence du clone 4C est illustrée à la figure 2) et pour transfecter des cellules Véro à l'aide soit d'un mélange adéquat avec des liposomes cationiques, tel que le 30 DOTAP (Boehringer-Mannheim), ou avec un agent non liposomal, tel que le FuGENE (Boehringer-Mannheim). Le FuGENE et l'ADN sont préincubés dans du milieu sans

sérum pendant 15 min puis le mélange est mis en contact avec un tapis cellulaire de cellules Vero pendant 24 h. Les cellules sont ensuite rincées à l'aide de PBS (*phosphate saline buffer*), fixées 20 min à température ambiante avec une solution de PBS contenant 3% de paraformaldéhyde, perméabilisées 5 min avec du PBS contenant 0,5% Triton X-100. La présence d'antigène NS1 est alors révélée à l'aide d'anticorps spécifiques, reconnus par un anticorps conjugué marqué à la fluorescéine.

2. Résultats

Il est possible de mettre ainsi en évidence par un signal fluorescent élevé, spécifique de l'antigène viral NS1, dans environ 20% des cellules transfectées.

L'expression de NS1 est ainsi démontrée et des lignées stables pourront être établies en présence de néomycine, marqueur de sélection des cellules transfectées.

La figure 2 illustre la séquence de la protéine NS1 du virus de la dengue de sérotype 1 ainsi obtenue ainsi que la séquence codante correspondante.

15 Exemple 3 : Mise en œuvre de la technique ELISA-capture selon l'invention dans le cadre d'une infection par le virus de la dengue de sérotype 1 et comparaison avec les méthodes de l'état antérieur de la technique

- 1. Principe de la technique ELISA-capture

L'antigène viral NS1 est capturé par des anticorps polyclonaux de souris monospécifiques préalablement purifiés par immunocapture sur la protéine NS1 hexamérique purifiée de dengue, sérotype 1.

La présence de NS1 est révélée par des anticorps de lapin immunisés par la protéine NS1 hexamérique purifiée, eux-mêmes reconnus par des anticorps conjugués à la peroxydase de raifort.

25 2. Matériel et méthodes

- Purification d'anticorps polyclonaux de souris dirigés contre la protéine NS1

a – *Fixation de la protéine NS1 sur membrane*

La protéine NS1 purifiée est fixée par adsorption sur une membrane de nylon amphotérique (Nytran, Schleicher & Schuell). La surface de la membrane est alors saturée par de l'albumine bovine présente à une concentration de 3 % dans une

solution saline tamponnée par du phosphate (PBS : *phosphate buffer saline* ; 10 mM phosphate ; pH7,2 ; 150 mM NaCl). Après 2 rinçages dans du PBS, la membrane est traitée par du PBS contenant 0,25 % de glutaraldéhyde pendant 15 min. à température ambiante. Après 3 rinçages dans du PBS, la membrane est neutralisée par un tampon
 5 de 100 mM glycine, 3 % albumine bovine, rincée 2 fois dans du PBS puis conservée à 4°C dans du PBS avec de l'azide de sodium 1 mM.

b - Purification des anticorps polyclonaux monospécifiques de souris, (anticorps de capture)

α) production des ascites polyclonales : les cerveaux de souriceaux

10 Swiss infectés par le virus de la dengue et moribonds sont broyés dans 9 ml de tampon PBS. Le produit est centrifugé 10 min à 10.000 g à 4° C.

La suspension virale est injectée à des souris Swiss, selon le calendrier suivant :

- J0 : 0,5 ml d'antigène en sous-cutané dans la cuisse,
- 15 - J3 : 0,4 ml d'antigène et 0,1 ml d'adjuvant complet de Freund par voie intrapéritonéale,
- J25 : 0,5 ml d'antigène par voie intrapéritonéale,
- J26 : 0,5 ml d'ascite de souris TG180, et
- J28 : 0,5 ml d'antigène par voie intrapéritonéale.
- 20 Les ascites sont récoltées à J42.

Après recueil des ascites, on laisse le coagulum se former pendant 1 heure à température ambiante puis on réalise une centrifugation pendant au moins 30 minutes à 1500 g. Le surnageant est laissé une nuit à 4°C. Le pH du surnageant est ajusté à 4,8 avec de l'acide acétique 2 M puis le surnageant est centrifugé de nouveau
 25 dans les mêmes conditions. Le pH du surnageant est alors amené à 7,0 – 7,2 par addition d'une solution de soude 2 N. Le surnageant peut être conservé à – 20°C.

β) purification des anticorps de souris spécifiques du virus de la dengue de sérotype 1:

La membrane est incubée pendant une heure à température ambiante
 30 dans un mélange d'ascites polyclonales dirigées contre les 4 sérotypes du virus de la dengue préparées comme décrit ci-dessus.

Après 3 rinçages de la membrane dans du PBS, les anticorps fixés sur la protéine NS1 sont élués avec une solution de diéthylamine pH 11,4 (milieu Dubelco modifié par Iscove (Gibco) contenant 100 mM diéthylamine). Les anticorps sont concentrés par ultrafiltration et replacés dans un tampon PBS contenant de l'azide de sodium 1 mM.

- 5 - Préparation d'anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre la protéine NS1 (anticorps de révélation) :

L'immunisation des lapins a été réalisée par 3 ou 4 injections successives de 30 µg de protéine NS1 hexamérique purifiée selon la méthode de l'exemple 1, réalisées à J0, J7, J21 et éventuellement à J49 et suivies d'une saignée à
10 blanc à J83. Le sérum est appauvri en anticorps anti-souris non spécifiques par incubation avec des billes de Sépharose portant un anticorps monoclonal décrit dans la littérature ou préparé comme décrit précédemment.

- Procédé ELISA-capture

a - *Courbe étalon*

15 Pour chaque plaque ELISA-capture destinée à tester des sérums humains, une gamme étalon est réalisée à partir d'une solution de protéine NS1 purifiée selon la méthode décrite au point 1, dont la concentration initiale est de 0,5 µg/ml et diluée de 3 en 3.

b - *Détection de la protéine NS1 circulante lors de la phase aiguë :*

20 Les anticorps polyclonaux de souris purifiés obtenus selon la méthode décrite précédemment (anticorps de capture) sont fixés sur une plaque, dilués dans une solution de PBS et mis à incuber pendant une nuit à 4°C. Après 3 rinçages de 5 minutes avec une solution de PBS/Tween 0,05 %, la plaque est saturée avec un mélange de PBS, Tween 0,05 % et de lait 3 %, pendant 30 minutes à température
25 ambiante. Après 3 rinçages avec une solution de PBS / Tween 0,05 %, on dépose plusieurs dilutions des sérums à tester et on laisse réagir pendant une heure, toujours à température ambiante. Les dilutions au 1/10, au 1/30 et au 1/90 sont réalisées dans une solution de PBS / Tween 0,05 %. Après 3 rinçages, on ajoute le second anticorps spécifique de NS1 (anticorps de révélation obtenu au point 3 précédent), après l'avoir
30 dilué dans un mélange de PBS / Tween 0,05 % et de lait 3 %, et on laisse incuber pendant 45 minutes à 37°C. Après 3 rinçages, l'anticorps anti-IgG dirigé contre le

deuxième anticorps et marqué à la peroxydase, ledit anticorps étant préparé dans des conditions classiques connues de l'homme du métier, est ajouté et l'incubation réalisée pendant 45 minutes à 37°C. Après 3 rinçages, on révèle pendant 10 minutes par une solution de TMB (3,3', 5,5'-tétraméthylbenzidine, Kierkegaard & Perry Lab).

- 5 La réaction colorimétrique est arrêtée avec de l'acide sulfurique.

c - Détermination de la fenêtre de détection

Les prélèvements sont réalisés chez des patients infectés par le virus de la dengue de sérotype 1, entre J0, marquant l'apparition des signes cliniques (initialement une fièvre indifférenciée) et J66 correspondant à la fin de la phase
10 convalescente.

Sur les sérums de ces patients, on recherche la présence de NS1 circulant selon la méthode ELISA-capture décrite au point 4 et on compare le résultat obtenu avec la positivité en IgM spécifiques mesurée en MAC-ELISA, lorsque les données sont disponibles.

15 3. Résultats

Ils sont illustrés dans les figures 3 et 4.

a - Détection de la protéine NS1 circulante lors de la phase aiguë :

La technique ELISA-capture selon l'invention permet de détecter la présence de la protéine NS1 dans la phase aiguë de la maladie et ce indépendamment
20 du fait que les malades aient une infection primaire ou secondaire.

Les résultats confirment que la présence de la protéine NS1 est transitoire, puisque dans les prélèvements réalisés en phase de convalescence, on ne détecte pas cette protéine (figure 3).

93 % des prélèvements en phase aiguë de la maladie, se révèle
25 négatif par le test MAC ELISA, alors que 100 % des prélèvements réalisés en phase convalescente se révèle positif dans ce même test (figure 3).

De la même façon, le test d'inhibition d'hémagglutination (IHA) ne permet pas de détecter l'infection par le virus de la dengue de sérotype 1 dans 80 % des cas en phase aiguë de la maladie mais ce test se révèle positif dans 100 % des
30 prélèvements réalisés en phase convalescente (figure 3).

b - Détermination de la fenêtre de détection

Les résultats sont rassemblés dans la figure 4.

Entre J1 et J6, la possibilité de détecter la protéine NS1 circulante oscille entre 83 % (à J2) et 100 % (à J5) des patients infectés. Au delà de J10, la protéine NS1 circulante n'est plus détectée, alors que la réponse en anticorps devient
5 prédominante.

La détection de la protéine NS1 circulante ne semble pas dépendante de la présence d'IgM spécifiques qui apparaissent dans certains cas à J3 et culminent à partir de J5.

Ainsi, la fenêtre de détection de l'antigène sérique NS1 par la
10 technique ELISA- capture selon la présente invention se situe de préférence entre J1 et J6 après l'apparition des signes cliniques.

REVENDICATIONS

1°) Méthode de détection précoce d'une infection flavivirale, caractérisée en ce qu'elle comprend la détection de la glycoprotéine non-structurale NS1 d'un flavivirus dans un échantillon biologique, pendant la phase clinique de l'infection, par une méthode immunologique mettant en œuvre au moins deux anticorps identiques ou différents,

- le premier anticorps ou anticorps de capture de la glycoprotéine NS1 étant constitué par des anticorps choisis dans le groupe constitué par :

- des anticorps polyclonaux préalablement sélectionnés par immunocapture sur la protéine NS1 dudit flavivirus, de forme hexamérique, dimérique ou monomérique, lesdites formes étant non dégradées et

- des mélanges d'anticorps monoclonaux anti-NS1 préalablement sélectionnés pour leur affinité pour la protéine NS1 dudit flavivirus, de forme hexamérique, dimérique ou monomérique, lesdites formes étant non dégradées, lesdits anticorps monoclonaux étant ensuite purifiés,

- le deuxième anticorps ou anticorps de révélation étant choisi dans le groupe constitué par :

- des anticorps polyclonaux dirigés contre la protéine NS1 de même type que celle à détecter et

- un mélange d'anticorps monoclonaux dirigés contre une protéine NS1 de même type que celle à détecter.

2°) Méthode de détection selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'infection flavivirale est une infection par le virus de la dengue.

3°) Méthode de détection selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que le premier anticorps est fixé sur un support solide convenable et le deuxième anticorps est éventuellement conjugué à un marqueur approprié.

4°) Méthode de détection selon la revendications 3, caractérisée en ce que lorsque le deuxième anticorps n'est pas conjugué à un marqueur, sa liaison à la protéine NS1 fixée sur le support solide, est alors détectée par un troisième anticorps conjugué à un marqueur convenable.

5°) Méthode de détection selon la revendication 4, caractérisée en ce que le troisième anticorps est conjugué à une enzyme.

6°) Méthode de détection selon la revendication 5, caractérisée en ce que :

5 - le premier anticorps ou anticorps de capture est constitué par des anticorps polyclonaux de souris, sélectionnés par immunocapture sur la protéine NS1 du virus de la dengue, ladite protéine étant sous forme hexamérique, et

 - le deuxième anticorps ou anticorps de détection de la présence de NS1 dans l'échantillon biologique à analyser, est constitué par des anticorps polyclonaux de lapin immunisé par de la protéine NS1 du virus de la dengue de
10 sérotype 1, ladite protéine étant sous forme hexamérique, la fixation dudit deuxième anticorps étant révélé par un troisième anticorps constitué par des anticorps, conjugués à la peroxydase et dirigés contre le deuxième anticorps.

7°) Coffret de diagnostic précoce d'une infection flavivirale,
15 caractérisé en ce qu'il comprend :

 - au moins un anticorps de capture et au moins un anticorps de révélation tels que définis dans l'une quelconque des revendications 1 à 6,

 - au moins un contrôle positif constitué par la protéine NS1 d'un flavivirus et/ou de différents sérotypes selon le flavivirus, ladite protéine, étant sous
20 forme hexamérique, dimérique ou monomérique, lesdites formes étant non dégradées, et

 - au moins un contrôle négatif constitué par un sérum humain normal.

8°) Coffret de diagnostic selon la revendication 7, caractérisé en ce
25 que ladite protéine NS1, sous ses différentes formes est obtenue à partir d'un surnageant de culture, soit de cellules de mammifères infectées, soit de cellules de mammifères transfectées par un plasmide recombiné, comportant le gène de la protéine NS1 d'un flavivirus ou un fragment dudit gène ou un fragment du génome flaviviral, lesdits fragments étant aptes à exprimer la protéine NS1.

9°) Coffret de diagnostic précoce d'une infection flavivirale selon l'une quelconque des revendications 7 ou 8, caractérisé en ce que la protéine NS1 est celle du virus de la dengue.

10°) Coffret de diagnostic précoce d'une infection flavivirale selon l'une quelconque des revendications 8 ou 9, caractérisé en ce que ledit plasmide a été déposé auprès de la Collection Nationale de Cultures et de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur sous le numéro I-2220, en date du 7 juin 1999.

11°) Procédé de purification de la protéine NS1 d'un flavivirus, sous forme hexamérique, à partir d'un surnageant de culture, soit de cellules de mammifères infectées, soit de cellules de mammifères transfectées par un plasmide recombiné, comportant le gène de la protéine NS1 ou un fragment dudit gène ou un fragment du génome flaviviral, lesdits fragments étant aptes à exprimer la protéine NS1, caractérisé en ce que l'on sépare la forme soluble de la protéine NS1 de la forme microparticulaire de ladite protéine,

15 - soit par traitement par un agent précipitant puis centrifugation à une vitesse supérieure ou égale à 10 000 g,

- soit par centrifugation à une vitesse supérieure ou égale à 50 000 g, avant l'étape de purification.

12°) Composition immunogène, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de principe actif la protéine NS1 d'un flavivirus, de forme hexamérique, éventuellement associée à d'autres protéines, en association avec au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

13°) Composition immunogène selon la revendication 12, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un mélange des protéines NS1 de forme hexamérique correspondant aux différents sérotypes du virus de la dengue.

14°) Utilisation de la protéine NS1 de forme hexamérique ou d'un de ses systèmes d'expression, pour la préparation d'une composition immunogénique, apte à induire la production d'anticorps *in vivo*.

15°) Utilisation d'au moins un anticorps monoclonal anti-NS1 préalablement sélectionné pour sa réactivité vis-à-vis de la protéine NS1 de forme hexamérique, dimérique ou monomérique, lesdites formes étant non dégradées, lesdits

anticorps monoclonaux étant ensuite purifiés, et modifiés pour la fabrication d'un médicament apte à induire une immunisation passive.

16°) Utilisation de la protéine NS1 de forme hexamérique dimérique ou monomérique, lesdites formes étant non dégradées, pour sélectionner *in vitro* des anticorps spécifiques anti-NS1.

17°) Composition immunogène, caractérisée en ce qu'elle comprend un principe actif sélectionné dans le groupe constitué par :

- un polynucléotide capable d'exprimer la protéine NS1 d'un flavivirus et

10 - un système d'expression comprenant au moins un promoteur capable de faire exprimer chez l'hôte où elle est injectée, l'ADN codant pour la protéine NS1 du flavivirus, ledit gène exprimant ladite protéine, en association avec au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

15 18°) Procédé d'expression d'un polynucléotide codant pour la protéine NS1 d'un virus de la dengue, caractérisé en ce qu'il comprend l'expression d'un polynucléotide tel que défini à la séquence SEQ ID N° 1, associé à un promoteur dudit polynucléotide dans des cellules eucaryotes convenables.

19°) Procédé d'expression d'un polynucléotide tel que défini à la séquence SEQ ID N° 1 selon la revendication 18, caractérisé en ce que le sérotype du virus de la dengue est le sérotype 1.

20°) Procédé de purification de la protéine NS1 selon la revendication 11, caractérisé en ce que le flavivirus est un virus de la dengue quelque soit son sérotype.

21°) Procédé de purification de la protéine NS1 selon les revendications 11 et 20, caractérisé en ce que le flavivirus est un virus de la dengue de sérotype 1.

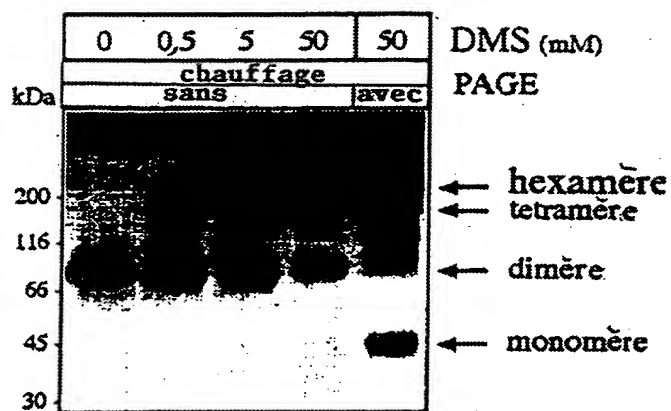


FIG. 1a

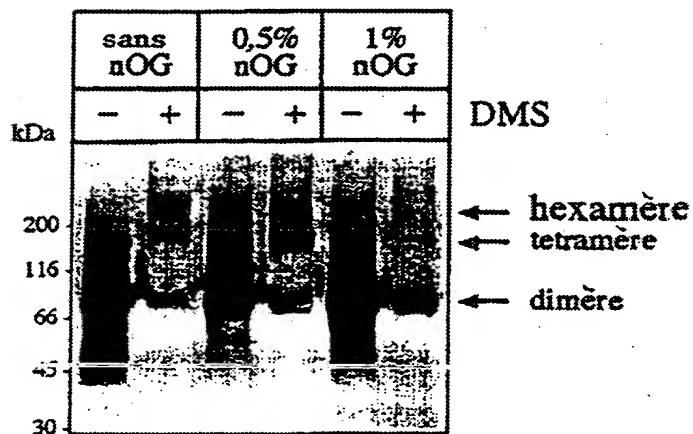


FIG. 1b

SEQ ID N° 1 : Protéine NS1 du virus de la dengue, sérotype 1

```

1/1
atg agg agc gcg tcg ctt tcg atg acg tgc att gca gtt ggc atg gtt aca ctg tac cta
Met arg ser ala ser leu ser met thr cys ile ala val gly met val thr leu tyr leu
61/21
gga gtc atg gtt caa gcg gac tcg gga tgc gta atc aac tgg aag ggc aga gaa ctc aaa
gly val met val gln ala asp ser gly cys val ile asn trp lys gly arg glu leu lys
121/41
tgt gga agt ggc att ttt gtc act aat gaa gtc cac act tgg aca gag caa tac aaa ttc
cys gly ser gly ile phe val thr asn glu val his thr trp thr glu gln tyr lys phe
181/61
cag gct gac tcc cca aaa aga ctg tca gca gcc att ggg aag gca tgg gag gag ggc gtc
gln ala asp ser pro lys arg leu ser ala ala ile gly lys ala trp glu glu gly val
241/81
tgt gga att cga tca gcc acg cgt ctt gag aac atc atg tgg aag caa ata tca aat gaa
cys gly ile arg ser ala thr arg leu glu asn ile met trp lys gln ile ser asn glu
301/101
ttg aac cac att cta ctt gaa aat gac atg aaa ttc aca gtc gtt gta gga gat gct aat
leu asn his ile leu leu glu asn asp met lys phe thr val val val gly asp ala asn
361/121
gga att ttg gcc cag ggg aaa aaa atg atc agg cca caa ccc atg gaa cac aaa tac tca
gly ile leu ala gln gly lys lys met ile arg pro gln pro met glu his lys tyr ser
421/141
tgg aaa agc tgg gga aaa gcc aag atc ata gga gca gac aca cag aat acc acc ttc atc
trp lys ser trp gly lys ala lys ile ile gly ala asp thr gln asn thr thr phe ile
481/161
atc gac ggc cca gac act cca gaa tgc ccc gat gac caa aga gcg tgg aac att tgg gaa
ile asp gly pro asp thr pro glu cys pro asp asp gln arg ala trp asn ile trp glu
541/181
gtt gag gac tat ggg ttt gga att ttc acg aca aac ata tgg ctg aaa ttg cgt gac tcc
val glu asp tyr gly phe gly ile phe thr thr asn ile trp leu lys leu arg asp ser
601/201
tac acc caa atg tgt gac cac cgg cta atg tca gct gcc gtc aag gac agc aag gca gtc
tyr thr gln met cys asp his arg leu met ser ala ala val lys asp ser lys ala val
661/221
cat gct gac atg ggg tac tgg ata gaa agt gaa aag aac gag acc tgg aag cta gcg aga
his ala asp met gly tyr trp ile glu ser glu lys asn glu thr trp lys leu ala arg
721/241
gcc tcc ttc ata gaa gtc aag aca tgc att tgg ccg aaa tcc cac act cta tgg agt aat
ala ser phe ile glu val lys thr cys ile trp pro lys ser his thr leu trp ser asn
781/261
gga gtt ttg gaa agt gaa atg ata atc cca aag ata tat gga gga cca ata tct cag cac
gly val leu glu ser glu met ile ile pro lys ile tyr gly gly pro ile ser gln his
841/281
aat tac aga cca ggg tat ttc aca caa aca gca ggg cca tgg cac cta ggt aag ttg gaa
asn tyr arg pro gly tyr phe thr gln thr ala gly pro trp his leu gly lys leu glu
901/301
ttg gat ttt gac ttg tgt gaa gcc acc aca gtt gtt gtg gat gaa cat tgt gga aat cga
leu asp phe asp leu cys glu gly thr thr val val val asp glu his cys gly asn arg
961/321
ggt cca tct ctc aga act aca aca gtc aca gga aag ata atc cat gaa tgg tgt tgc aga
gly pro ser leu arg thr thr thr val thr gly lys ile ile his glu trp cys cys arg
1021/341
tcc tgc acg tta ccc ccc tta cgc ttc aga gga gaa gac gga tgt tgg tat ggc atg gaa
ser cys thr leu pro pro leu arg phe arg gly glu asp gly cys trp tyr gly met glu
1081/361
atc aga cca gtt aag gag aag gag gag aac cta gtt agg tca atg gtc tct gca taa
ile arg pro val lys glu lys glu glu asn leu val arg ser met val ser ala

```

FIG.2

I.D.	IHA				MAC ELISA	ELISA-Capture (NSI)		
	D1	D2	D3	D4		10ème	30ème	90ème
NOL 1	0	0	0	NR	NEG	0.24	0.16	0.13
NOL 2	10	40	10	NR	POS	0.13	0.10	0.09
NOT 1	0	0	0	NR	NEG	0.54	0.26	0.14
NOT 2	40	160	160	NR	POS	0.01	0.01	0.01
MONT 1	0	0	0	NR	NEG	1.02	0.67	1.40
MONT 2	320	40	20	NR	POS	0.03	0.02	0.02
BAIL 1	0	0	0	NR	NEG	1.20	0.83	1.00
BAIL 2	80	160	160	NR	POS	0.06	0.07	0.08
LEG 1	0	0	0	0	NEG	1.50	1.09	1.35
LEG 2	160	80	160	NR	POS	0.05	0.05	0.06
SGH 1	0	0	0	NR	NEG	0.76	0.54	1.26
SGH 2	80	640	160	NR	POS	0.03	0.02	0.03
DETT 1	0	0	0	NR	NEG	0.24	0.13	0.09
DETT 2	640	160	160	NR	POS	0.05	0.05	0.04
CON 1	0	0	0	0	NEG	0.23	0.10	0.10
CON 2	1280	1280	1280	1280	POS	0.12	0.07	0.03
BOLL 1	0	0	0	0	NEG	0.42	0.48	0.23
BOLL 2	1280	1280	1280	1280	POS	0.09	0.08	0.20
PORN 1	0	0	0	NR	NEG	0.54	0.54	0.30
PORN 2	1280	1280	1280	1280	POS	0.02	0.02	0.01
PAJ 1	0	0	0	0	NEG	1.71	1.27	1.58
PAJ 2	1280	1280	1280	1280	POS	0.07	0.07	0.06
PLAQ 1	10	20	20	NR	NEG	1.32	0.86	1.43
PLAQ 2	1280	1280	1280	1280	POS	0.28	0.18	0.18
GOH 1	10	40	20	NR	NEG	1.35	1.15	0.26
GOH 2	1280	1280	1280	1280	POS	0.06	0.09	0.14
BEAU 1	10	20	20	40	POS	1.01	0.76	0.53
BEAU 2	1280	1280	1280	1280	POS	0.07	0.08	0.07

FIG. 3

	ELISA NS ₁ +			ELISA NS ₁ ?			ELISA NS ₁ -		
	IgM -	IgM ?	IgM+	IgM -	IgM ?	IgM+	IgM -	IgM ?	IgM+
J0		1		1					
J1	11	1		1			2	1	
J2	7	2	1		1		5	1	
J3	9	1	4				3		
J4	4	3	4			2			
J5		2	6						
J6			3						1
J7			1						1
J8									1
J9			1						2
J11 a J66									32

FIG. 4

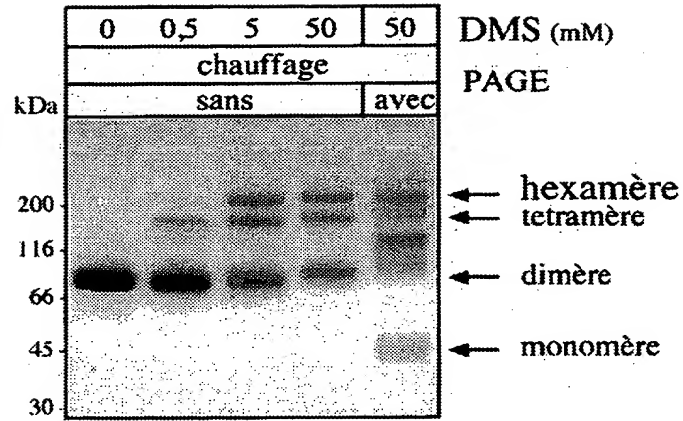


FIG. 1a

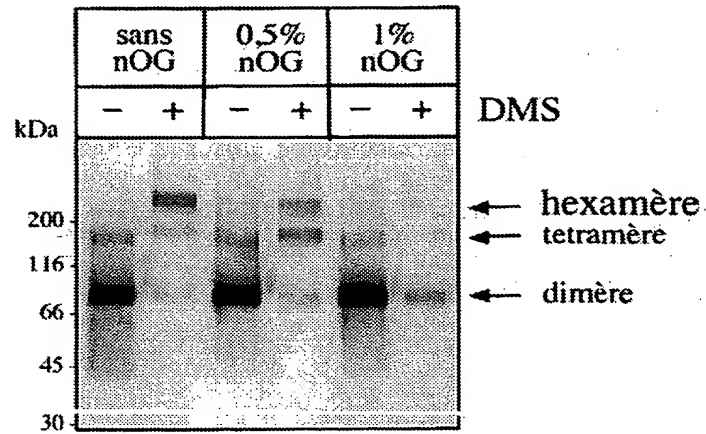


FIG. 1b

I.D.	IHA				MAC ELISA	ELISA-Capture (NSI)		
	D1	D2	D3	D4		10ème	30ème	90ème
NOL 1	0	0	0	NR	NEG	0,24	0,16	0,13
NOL 2	10	40	10	NR	POS	0,13	0,10	0,09
NOT 1	0	0	0	NR	NEG	0,53	0,26	0,14
NOT 2	40	160	160	NR	POS	0,01	0,01	0,01
MONT 1	0	0	0	NR	NEG	1,02	0,67	0,44
MONT 2	320	40	20	NR	POS	0,03	0,02	0,02
BAIL 1	0	0	0	NR	NEG	1,20	0,83	0,64
BAIL 2	80	160	160	NR	POS	0,06	0,07	0,08
LEG 1	0	0	0	0	NEG	1,50	1,09	0,56
LEG 2	160	80	160	NR	POS	0,05	0,05	0,06
SGH 1	0	0	0	NR	NEG	0,76	0,54	0,26
SGH 2	80	640	160	NR	POS	0,03	0,02	0,03
DETT 1	0	0	0	NR	NEG	0,23	0,13	0,09
DETT 2	640	160	160	NR	POS	0,05	0,05	0,04
CON 1	0	0	0	0	NEG	0,23	0,10	0,10
CON 2	1280	1280	1280	1280	POS	0,12	0,07	0,03
BOLL 1	0	0	0	0	NEG	0,42	0,48	0,23
BOLL 2	1280	1280	1280	1280	POS	0,09	0,08	0,20
PORN 1	0	0	0	NR	NEG	0,54	0,54	0,44
PORN 2	1280	1280	1280	1280	POS	0,02	0,02	0,01
PAJ 1	0	0	0	0	NEG	1,71	1,27	0,73
PAJ 2	1280	1280	1280	1280	POS	0,07	0,07	0,06
PLAQ 1	10	20	20	NR	NEG	1,32	0,86	0,43
PLAQ 2	1280	1280	1280	1280	POS	0,28	0,18	0,18
GOH 1	10	40	20	NR	NEG	1,35	1,15	0,26
GOH 2	1280	1280	1280	1280	POS	0,06	0,09	0,14
BEAU 1	10	20	20	40	POS	1,01	0,76	0,53
BEAU 2	1280	1280	1280	1280	POS	0,07	0,08	0,07

FIG. 3

THIS PAGE BLANK (USPTO)